Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik München
Direktor: Professor Dr. W. Stepp.

Ein Verfahren zur Durchführung von Reihenbestimmungen der Acetonkörper in kleinsten Mengen Capillarblut unter Berücksichtigung der Möglichkeit einer gleichzeitigen Erfassung der Milchsäure.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Josef Frauenreuther
aus München.

1940

Buchdruckerei Richard Mayr, Würzburg

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Referent: Professor Dr. W. Stepp.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Obwohl der intermediäre Stoffwechsel der Fette und Kohlehydrate seit Jahrzehnten Gegenstand intensivster klinisch-chemischer Forschung ist, gibt es noch eine Fülle von Problemen, deren systematische Bearbeitung in ausgeprägtem Maße für die Therapie verschiedener Stoffwechselkrankheiten, daneben aber auch für die klare Erkenntnis der tieferen Zusammenhänge der physiologischen und pathologischen Vorgänge von größter Wichtigkeit ist.

Für die Anlage solcher intermediären Stoffwechselversuche sind im wesentlichen folgende Gesichtspunkte in Betracht zu ziehen. Die enge Verflechtung der einzelnen Stoffwechselgebiete und deren vielfältige Beziehungen untereinander bringen es mit sich, daß irgendeine Abweichung vom normalen Ablauf der Stoffwechselprozesse immer das Endergebnis des Zusammenwirkens der verschiedensten Faktoren ist. Zur Erzielung eindeutiger und aufschlußreicher Erkenntnisse ist es deshalb erforderlich, auf möglichst breiter Basis zu arbeiten.

Zum andern ergibt sich aber wiederum die Notwendigkeit einer Begrenzung des für die Bestimmung erforderlichen Untersuchungsmaterials. Eine häufige, in kurzen Zeiträumen aufeinander folgende Blutentnahme bedeutet für die Versuchsperson nicht nur eine erhebliche Unannehmlichkeit, sondern birgt die Gefahr einer unkontrollierbaren Störung der Versuchsergebnisse in sich durch die Entziehung größerer Blutmengen.

Im Rahmen vorliegender Untersuchungen interessierte uns besonders die exakte Erfassung der Acetonkörper in kleinsten Blutmengen. Gleichzeitig wurde in diesem Zusammenhang noch die überaus wichtige Frage berücksichtigt, in wieweit sich die Anwesenheit der Milchsäure und anderer Stoffe störend auf die einwandfreie Bestimmung der Acetonkörper im Blut auswirken können.

In vielen Fällen genügt es zwar, unter Berücksichtigung der bereits angeführten Gesichtspunkte, bei der experimentellen Bearbeitung von Stoffwechselfragen nicht, nur einen Faktor des intermediären

Stoffwechsels zu untersuchen. Erst die Verschiebung des Verhältnisses der Konzentration dieses Stoffes zu den anderen läßt ein Bild von der Struktur des intermediären Stoffwechselgeschehens gewinnen. Aus diesem Grunde ist es von vornherein unmöglich, bei derartigen Untersuchungen mit Blutmengen auszukommen, die aus der Fingerbeere entnommen werden, weil auf diese Weise nur 0,4—0,5 ccm Blut zu erhalten sind. Bei dem heutigen Stand unserer methodischen Möglichkeiten gibt es nur eine ganz beschränkte Reihe von stoffwechselwichtigen Substanzen, für deren exakte Bestimmung diese Menge gerade genügt. Zur Erfassung mehrerer Stoffe nebeneinander ist deshalb eine Venenpunktion unumgänglich. In solchen Fällen ist es aber wiederum nicht erforderlich, sich auf zu kleine Blutmengen für die jeweiligen Untersuchungen zu beschränken.

Andererseits gibt es aber eine Reihe von Fragen, für deren Bearbeitung das Vorhandensein einer Mikromethode, die Bestimmungen in kleinsten Blutmengen gestattet, erwünscht ist.

Aber nicht allein aus diesem Grunde, sondern auch zur Vermeidung einer zu weitgehenden Abweichung von der eigentlichen Problemstellung, ist häufig eine Begrenzung der zu erfassenden Faktoren angebracht. Die Durchführung derartiger Untersuchungen erfolgt deshalb zweckmäßig im Rahmen eines bestimmten Teilgebietes, das sich auf Grund bestimmter physiologischer Zusammenhänge ergibt. Die Abtrennung eines solchen Fragekomplexes stellt z. B. die Bearbeitung des intermediären Fett- und Kohlehydratstoffwechsels im Rahmen des Rest-Kohlenstoffproblems dar, das besonders an der Steppschen Klinik seit langem eine bedeutende Rolle in dieser Hinsicht gespielt hat.

Die Tatsache, daß trotz jahrzehntelanger Arbeit noch eine ganze Reihe von sehr naheliegenden Fragen auf dem Gebiete des intermediären Stoffwechsels unbeantwortet blieb, hat ihre Ursache sicherlich zum größten Teil in dem Mangel an geeigneten analytischen Untersuchungsmethoden. Zur Klärung der noch offenstehenden Fragen müssen deshalb in erster Linie die methodischen Grundlagen geschaffen werden, die es gestatten, eine erfolgreiche Bearbeitung durchführen zu können. Die von Stepp angebahnten Bemühungen zur Aufteilung des Restkohlenstoffs haben gerade hinsichtlich einer systematischen Erforschung der intermediären Stoffwechsel-

vorgänge besondere Wichtigkeit. Aus diesem Grunde wurden in den letzten Jahren an unserer Klinik eine Reihe neuer Bestimmungsverfahren ausgearbeitet, die eine exakte Erfassung von Gesamtaceton, β-Oxybuttersäure und Milchsäure erlauben. Weiter wurde in diesem Zusammenhang ein Verfahren zur Durchführung der Aufteilung des Stickstoffs in seine Fraktionen Harnstoff, Aminosäure-N und Ammoniak vorschlagen. Zur Durchführung von Rest-C- und C/N-Bestimmungen wurde ein Verfahren zur quantitativen Erfassung des Kohlenstoffs ausgearbeitet, das in neuester Zeit auf Grund jahrelanger Erfahrung seine zweckmäßigste Gestaltung in der Modifikation von Lauersen und Boldt gefunden hat.

Die bei der Ausarbeitung der Methoden maßgebenden Gesichtspunkte waren, solche Verfahren zu schaffen, die bei Anwendung kleiner Blutmengen und bei einfachem Arbeitsgang in möglichst kurzer Zeit exakte Werte liefern. Wenn bei der Ausarbeitung dieser Methoden häufig die analytische Erfassung nach bereits bekannten Prinzipien erfolgt, so ist zu berücksichtigen, daß das Wesentliche einer Methode nicht auf dem Prinzip, sondern vielmehr auf der praktischen Durchführbarkeit beruht, die durch die apparative Anordnung gegeben ist. Da bei den Bestimmungsverfahren im allgemeinen nur die ihnen zugrundeliegende chemische Reaktion als das Prinzip der Methode angesehen wird, so wäre es bei dem heutigen Stande der analytischen und präparativen Chemie kaum möglich, eine neue Bestimmungsmethode zu schaffen.

Wichtig ist zum Beispiel für die Deutung von experimentellen Befunden die Kenntnis der normalen Konzentration der einzelnen Bestandteile des Blutes und der mittleren Schwankungsbreite dieser Werte, nicht nur in einem bestimmten Augenblick, sondern zu verschiedenen Zeitabschnitten des sich unter normalen Lebensbedingungen abspielenden Stoffwechselgeschehens. Der Nachweis des Erfolges einer therapeutischen Maßnahme oder der Auswirkung einer experimentellen Beeinflussung ist häufig erst durch die systematische Verfolgung der erzielten Schwankungen der Konzentration eines bestimmten Stoffes in möglichst kleinen Zeitintervallen zu erbringen. Dies ist vor allem insofern wichtig, als der Eintritt der Wirkung zu den verschiedensten Zeitpunkten erfolgen kann. Hier ist die Aufstellung von Tagesprofilen sehr aufschlußreich.

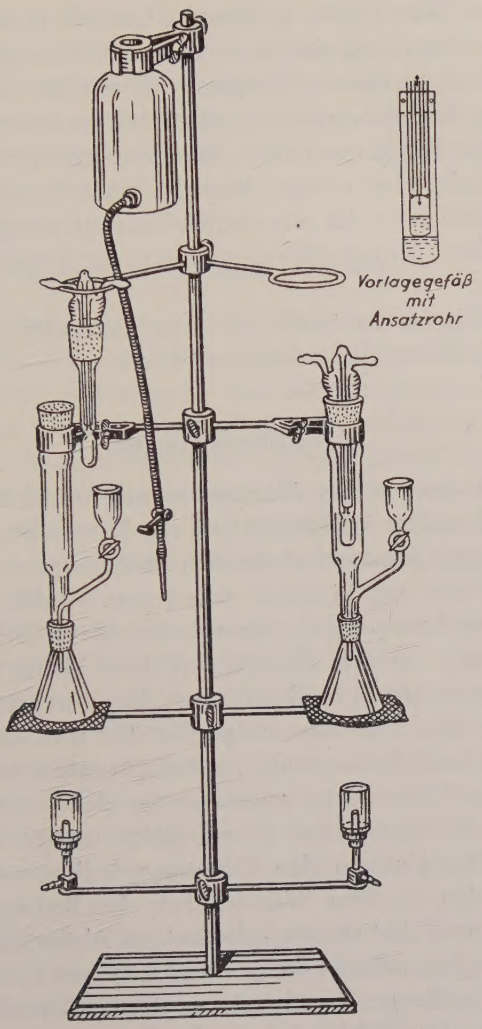
In Erkenntnis dieser Notwendigkeit haben wir uns bemüht, eine ausgesprochene Mikromethode für die Bestimmung der Acetonkörper auszuarbeiten. Die Acetonkörper spielen sowohl in physiologischer als auch in pathologischer Hinsicht eine wichtige Rolle und waren bisher einer experimentellen Beobachtung nur schwer zugänglich. Die gleichzeitige Durchführung von Reihenbestimmungen der Acetonkörper und des Blutzuckers läßt den Grad der Abwandlung intermediärer Stoffwechselzustände besser beurteilen als eine alleinige Blutzuckerkontrolle, vor allem bei Diabetes mellitus, bei dem eine Parallelität im Verhalten der Acetonkörper und des Blutzuckers nicht unbedingt zu bestehen braucht.

Von außerordentlicher Bedeutung ist die Verfolgung der Insulineinwirkung beim diabetischen Koma und bei präkomatösen Zuständen, nicht allein hinsichtlich des therapeutischen Erfolges, sondern auch im Hinblick auf den Mechanismus der Insulineinwirkung. Weiterhin läßt sich die Rolle der Acetonkörper bei verschiedenen Formen von Fettsucht und anderen endokrinen Störungen und ganz allgemein bei der Verwertung der Fette unter den verschiedensten physiologischen und pathologischen Verhältnissen laufend kontrollieren.

Zur Schaffung dieser Methoden wurde das bereits an anderer Stelle beschriebene Verfahren von Lauersen zur Acetonkörperbestimmung soweit ausgebaut, daß mittels des Stufenphotometers Acetonmengen in der Größenordnung von einigen Gamma erfaßt werden können. Wesentliche Änderungen der bereits bestehenden Vorschriften waren dabei nicht nötig, vielmehr kam es darauf an, die methodischen Erfahrungen bei der Durchführung unserer überaus zahlreichen Bestimmungen zusammenzufassen und in Form einer detaillierten zweckmäßigen Arbeitsvorschrift die sich bietenden Möglichkeiten unseres Destillationsverfahrens voll auszuwerten.

Apparatur.

Der Destillationsapparat ermöglicht die quantitative Abtrennung des Acetons aus dem Reaktionsgemisch und seine gleichzeitige Bindung an Salicyldehyd. Die Einzelheiten der Apparatur wurden bereits an anderer Stelle beschrieben.



Wesentlicher Bestandteil des Apparates ist der Destillationsaufsatz, in den ein Vorlagegefäß eingefügt werden kann. Ein besonderer Zapfenkühler verschließt den Aufsatz. Der Kühlerzapfen ragt mit seinem unteren Ende bis in die Mitte des Vorlagegefäßes und geht in ein kurzes Ansatzrohr über, das etwas in die Vorlageflüssigkeit taucht. Ein Erlenmeyerkolben wird als Reaktionsgefäß benutzt. Beim

Erhitzen des Kolbeninhalts steigen die Dämpfe in den Destillationsaufsatz. Im unteren und mittleren Teil des Aufsatzes verdichtet sich der größte Teil des Wasserdampfes, während der Dampf des leichter flüchtigen Acetons durch den allmählich nachsteigenden Wasserdampf an den Kühler gedrängt, dort kondensiert wird und in die Vorlage abfließt. Hier erfolgt dann die Bindung an Salicylaldehyd. Unter Umständen in der entweichenden Luft mitgeführte Acetondämpfe werden durch das Waschsystem in der Vorlageflüssigkeit abgefangen.

Das Aceton wird zu 100% mit einer durchschnittlichen Schwankung von ±3% um den Mittelwert erfaßt.

Arbeitsbedingungen.

Während in der früheren Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der Acetonkörper im Blut zur Feststellung der Normalkonzentration wegen der geringen darin vorhandenen Acetonmengen 1 bis 2 ccm Blut erforderlich waren, soll in dieser Arbeit eine Modifikation des Verfahrens beschrieben werden, die eine Erfassung kleinster Acetonmengen bis zu 1 Gamma erlaubt. Auf diese Weise ist es möglich, exakte Bestimmungen in 0,1 bis 0,2 ccm Blut durchzuführen, so daß im Gegensatz zu früher das nötige Blut für eine Bestimmung der Acetonkörper auch bei normaler und nur wenig erhöhter Konzentration aus der Fingerbeere gewonnen werden kann.

Bei Beginn der Destillation ist auf einige wesentliche Punkte zu achten. Die Flüssigkeit in den Erlenmeyerkolben soll nach 6 bis 7 Minuten sieden, da diese Wärmezufuhr den Bedingungen genügt, die Voraussetzung sind für ein vollständiges Abdestillieren des Acetons in das Vorlagegefäß in der vorgeschriebenen Gesamtdauer von 20 Minuten. Zu diesem Zweck müssen die Gasflammen richtig eingestellt werden. Die Stärke des Gasdrucks kann aber während der Tagesstunden häufig verschieden sein, besonders in Krankenhäusern, in denen durch den Küchenbetrieb die Gaszuleitung zeitweilig einer starken Beanspruchung ausgesetzt ist. Deshalb ist es unter Umständen vorteilhaft, eine selbsttätige Gasdruckregulierung anzubringen. Wichtig ist weiter, das Reaktionsgemisch im Erlenmeyerkolben stets vor Beginn der eigentlichen Destillation auf ein gleichbleiben-

des Volumen von 40 ccm aufzufüllen. Die Destillationsapparatur muß vor Luftzug geschützt werden, um ein gleichmäßiges Sieden zu gewährleisten. Weitere Bedingungen für ein einwandfreies Gelingen des Verfahrens sind ein ordnungsgemäßes Arbeiten der Kühlung, Überprüfung der Reagenzien und Verwendung einer möglichst frischen Salicylaldehydlösung.

Stufenphotometrische Auswertung:

Nach Beendigung der Destillation wird die Vorlageflüssigkeit auf 10 ccm mit Aqua dest. aufgefüllt. Durch die Auffüllung auf 10 ccm läßt sich bei einer Ablesung in den üblichen 30 mm-Zeißküvetten fast das gesamte Absorptionsvermögen der Farblösung erfassen und dadurch die stufenphotometrische Auswertbarkeit niedriger Konzentrationen bedeutend verbessern. Da auf diesem Wege Aceton noch in einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 erkennbare Absorptionen zeigt, sind durch das Verfahren noch Mengen bis zu einem Gamma zu erfassen.

Zeigt sich bei der Ablesung im Stufenphotometer eine stärkere Absorption als 20% für Filter S 57, dann ist es vorteilhafter, bis 20 ccm zu verdünnen. Im Blut sind die Normalwerte für Aceton 0,4—0,8 mg%, für β-Oxybuttersäure 1,5—2,5 mg% und für Gesamtaceton (berechnet als Aceton) 1,2—1,8 mg%. Dagegen finden sich bei Diabetes oft 20—40 mg% und im Koma 50 und mehr mg% Aceton und β-Oxybuttersäure, auch bei Hunger- und Arbeitsacidosen können die Werte um viele 100% gegenüber der Norm erhöht sein.

Die photometrische Ablesung erfolgt gegen Wasser als Vergleichslösung. Bei der Auswahl des für die Ablesung geeignetsten Filters wurden die Durchlässigkeitswerte unter Anwendung von Acetontestlösungen für die verschiedenen Spektralbereiche gemessen. Die konstantesten Werte erhielten wir, wie auch bereits früher schon gefunden wurde, mit Filter S 57. Bei der Ablesung stärkerer Absorptionen mit Filter S 57 zeigt sich häufig eine deutliche Differenz hinsichtlich der Farbtönung der beiden Vergleichsflächen des Filters, die sich aber bei einiger Erfahrung trotzdem auswerten lassen. Die stärkeren Absorptionen, die wir bei Filter S 53 und 47 finden, kön-

nen zwar auch bei der Ablesung schwacher Absorptionen benutzt werden. Immerhin ist zu erwähnen, daß wir im biologischen Material häufig höhere Werte finden, als sie der Ablesung mit Filter S 57 jeweils entsprechen müßten. Wir führen diese Erscheinung auf das Vorhandensein von Farbstoffen zurück, die sich durch Umsetzung von Salicylaldehyd mit anderen, vorläufig noch unbekannten Substanzen gebildet haben können.

Einfluß anderer flüchtiger Substanzen auf die Bestimmung von Acetonkörpern.

Wie schon an anderer Stelle gezeigt wurde, übt die Anwesenheit von Milchsäure und Glukose auf die Bestimmung der Acetonwerte keinen störenden Einfluß aus, da eventuell hierdurch verursachte Färbungen, die besonders bei der Bestimmung der β-Oxybuttersäure zu Fehlern Anlaß geben könnten, durch die Ablesung mit Filter S 57 im Stufo auszuschalten sind.

Gegen die Benützung des Filters S 57 wurden verschiedene Einwände erhoben, sodaß uns daran gelegen ist, die Stichhaltigkeit dieser Einwände einer eingehenden Nachprüfung zu unterziehen. In diesem Zusammenhang sei gleich auf die Arbeit Schwenkenbechers „Untersuchungen der Ketonämie (Methode Lauersen) bei Diabetes mellitus und anderen Krankheiten" eingegangen.

Zunächst sei bemerkt, daß Schwenkenbecher noch mit der Lauersen'schen Apparatur von 1935 arbeitet. Schon aus diesem Grunde läßt sich kein richtiger Vergleich aufstellen, da durch die Anbringung einer Waschvorrichtung eine viel genauere Erfassung des isolierten Acetons möglich wurde.

Schwenkenbecher vertritt die Ansicht, daß nach Oxydation der verschiedensten Substanzen des Blutes durch Kaliumbichromat Acetaldehyd entstehen und dieser dann zu Fehlermöglichkeiten bei der Acetonbestimmung führen kann.

So versucht Schwenkenbecher den Einfluß von Acetaldehyd, Äthylalkohol, Glycerin und Triolein auf die Acetonbestimmung festzustellen und findet nach Oxydation „vorgetäuschte Acetonwerte" von 0,01—1,2 mg. Diese Zahlen könnten als Beleg eines berechtigten Einwands gelten, wenn solche Mengen verwendet worden

wären, die unter normalen und pathologischen Bedingungen im Blut möglich sind. Schwenkenbecher hat jedoch bei diesen Versuchen nicht berücksichtigt, daß entsprechend der damals angewandten Menge Blutes von 2 ccm auch die zu prüfenden Substanzen in entsprechendem Mengenverhältnis zugegeben werden müssen. Im Blut sind beispielsweise unter physiologischen Bedingungen 3—4 mg% Äthylalkohol enthalten. Erhebliche Erhöhungen des Alkoholspiegels unter normalen Versuchsbedingungen und bei pathologischen Zuständen, abgesehen von akuten Alkoholintoxikationen werden nicht beobachtet. Schwenkenbecher legt 0,004 g Äthylalkohol vor. Diese Menge entspricht bei Verwendung der damals von uns vorgeschlagenen Anwendung von beispielsweise 2 ccm Blut pro Einzelbestimmung einem Alkoholgehalt von 200 mg%. Wenn schon bei derartig unmöglich hoher Äthylalkoholkonzentration nur ein „vorgetäuschter" Acetonwert von 0,024 mg gefunden wird, so zeigt dies in aller Deutlichkeit den Mangel jeglicher Stichhaltigkeit seiner Kritik. Noch gewaltigere Zahlen finden wir bei dem Versuch, die Farbentwicklung festzustellen, die durch Glycerin vorgetäuscht werden könnte. In diesem Falle finden beispielsweise 0,13 g Glycerin Anwendung, entsprechend einer Konzentration von 6500 mg%. Auch hier erhält Schwenkenbecher einen durchaus gleichwertigen „vorgetäuschten" Wert von 0,024 mg.

Auffallend ist bei den angeführten Werten, daß Schwenkenbecher häufig, sowohl bei der „direkten Destillation", als auch bei der Destillation nach Zusatz von Bichromatlösung Werte um 0,020 mg findet. Diese Tatsache, daß von 10 in verschiedenen Versuchen gefundenen Absorptionswerten 8 nahe um 90% liegen, läßt uns vermuten, daß in diesen Versuchen die Eigenfärbung der Salicylaldehydvorlage festgestellt wurde, da es sonst kaum verständlich ist, wenn Schwenkenbecher bei den erheblichen Unterschieden hinsichtlich der angewandten Mengen so häufig fast den gleichen stufenphotometrischen Ablesungswert findet.

Beim Vergleich der Absorptionswerte für Filter S 57 und S 47 zeigt sich durchaus keine Parallelität. Dies mag als Hinweis dienen dafür, daß die Anwendung des Filters S 47 nicht geeignet ist zur Erzielung einwandfreier Werte, wie bereits von Lauersen an anderer Stelle betont wurde.

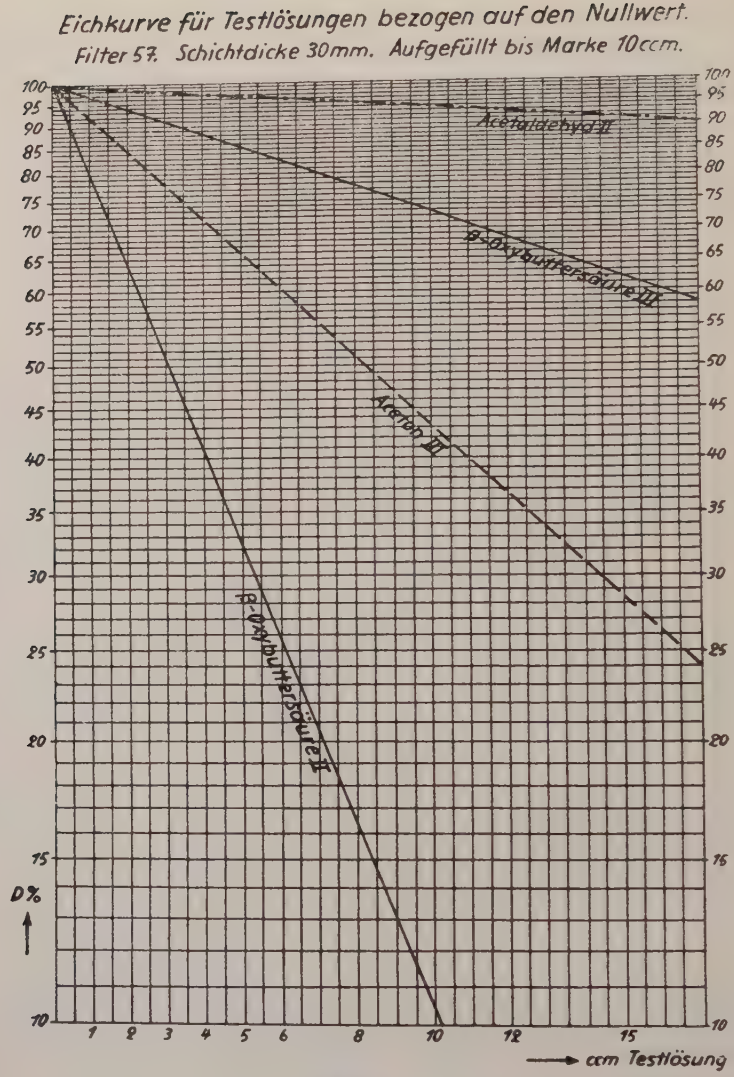


Abb. 1.

Unter Zugrundelegung solcher Werte, wie sie unter normalen und pathologischen Bedingungen zu finden sind, könnte die Kritik Schwenkenbechers als Bestätigung der Angaben Lauersens betrachtet werden.

Durch die Kritik Schwenkenbechers angeregt, untersuchten wir Acetaldehyd, Milchsäure, Glukose und Brenztraubensäure hinsichtlich ihres störenden Einflusses auf die Aceton- und vor allem β-Oxybuttersäurebestimmung mit Filter S 57.

In gleicher Weise wie für Aceton wurde eine Eichkurve für Acetaldehyd aufgestellt. Der Acetaldehyd wurde durch Oxydation einer Milchsäurelösung bekannten Gehalts mit MnO_2 im Reaktionsgemisch gebildet, wie es bei der Bestimmung der Milchsäure geschieht. Als Vorlage dient das Salicylaldehydgemisch für die Acetonbestimmung. In der Abb. 1 sind die entsprechenden Eichkurven aufgezeichnet und es zeigt sich, daß die durch Acetaldehyd hervorgerufene Färbung außerordentlich gering ist. Acetaldehyd kommt stets nur in Spuren vor, sodaß mit einer Störung der Absorptionswerte für Aceton nicht zu rechnen ist.

Außerdem war zu prüfen, ob bei Anwesenheit von Milchsäure die Durchlässigkeitswerte bei der β-Oxybuttersäurebestimmung geändert werden. Zu diesem Zweck wurde eine bestimmte Menge β-Oxybuttersäurelösung einmal ohne und einmal mit Milchsäurezusatz unter den üblichen Reaktionsbedingungen verarbeitet. Die angewandte β-Oxybuttersäurelösung ergab eine Absorption um 33,5% für Filter S 57 entsprechend 0,072 mg Aceton. Bei Zusatz von 0,8 mg Milchsäure wurde eine Absorption von 34,0% erhalten, also ein Wert, der mit dem vorher angeführten praktisch gleich ist. Hieraus ergibt sich, daß nur die β-Oxybuttersäure als Aceton überdestilliert, da als Oxydationsmittel Kaliumbichromat verwendet wird und, wie an anderer Stelle erwähnt, der aus Milchsäure entstehende Acetaldehyd sofort weiter oxydiert wird und nicht in die Vorlage gelangt. Der völlige Abbau des aus Milchsäure entstehenden Acetaldehyds durch Kaliumbichromat unter den üblichen Arbeitsbedingungen konnte durch weitere Versuche erwiesen werden, die in folgender Tabelle zusammengefaßt sind:

Bestimmung des Leerwerts in Gegenwart von Milchsäure:

Filter	Leerlösung	Milchsäuremenge	
		0,32 mg	0,80 mg
S 57	93	93	92
S 57	94	94	91

Wie sich aus der Tabelle ergibt, zeigen sich Schwankungen innerhalb der Fehlergrenze, so daß sich Störungen selbst bei Anwesenheit größter Milchsäuremengen nicht bemerkbar machen. Die in der Tabelle angeführten Zahlen wurden bei Anwendung unserer neuen Arbeitsvorschrift gefunden. Da hierbei die Vorlageflüssigkeit auf 10 ccm (statt auf 20 ccm) aufgefüllt wurde, müßten störende Einflüsse noch deutlicher als bei den früheren Bedingungen in Erscheinung treten.

Zur Prüfung des Einflusses von Glukose haben wir eine Menge von 5 mg angewandt und es ergibt sich folgendes Bild:

Bestimmung des Leerwerts in Gegenwart von Glukose.

Vorgelegt	Ablesung Prozent D				Leerwert Prozent D	
	Aceton		β-Oxybuttersäure			
	S 57	S 53	S 57	S 53	S 57	S 53
5 mg	90	80,5	89,5	65	91	80
Glukose	89,5	90	89	64,5	90,5	81

Wenn wir annehmen, daß wir die Bestimmung in 0,2 ccm Blut durchführen, müßte diese Menge 2500 mg% entsprechen, also ein Wert, wie er praktisch nie vorkommt. Hinzuweisen ist nur auf die Abweichung der Absorptionswerte für Filter S 53, die im Gegensatz zu Filter S 57 in Anbetracht der hohen Mengen einen, zwar nur geringen, störenden Einfluß erkennen lassen.

Auch die Brenztraubensäure wurde einer Nachprüfung unterzogen, um festzustellen, in wieweit sich Störungen auf die Acetonwerte bemerkbar machen. Das Ergebnis schließt eine nachteilige Einwirkung der Brenztraubensäure aus.

Versuchsbedingungen wie bei der Acetonbestimmung.

Filter	Leerwert		Brenztrbs. 1 mg
S 57	92	91	92
S 53	79,5	80	80

Einfluß der Konzentration von Schwefelsäure und Bichromat bei der Bestimmung der β-Oxybuttersäure.

Die Tatsache einer Abhängigkeit der Acetonausbeute bei der Oxydation der β-Oxybuttersäure von der Zusammensetzung des Oxy-

dationsgemisches ist bereits seit langem bekannt. Über das günstigste Mischungsverhältnis des Bichromats und der Schwefelsäure zur Erzielung einer optimalen Acetonausbeute liegen in der Literatur die verschiedensten Ansichten vor. So steht Krainick auf dem Standpunkt, der zwar aus der eigentlichen Besprechung seiner Arbeit nicht eindeutig hervorgeht und erst in einer bisher nicht veröffentlichten Erwiderung zu Lauersens Bemerkungen ausdrücklich betont wird, daß die Ausbeute allein von der Schwefelsäurekonzentration bestimmt wird. Krainick findet eine maximale Ausbeute bei einer scharf begrenzten optimalen Zusammensetzung des Oxydationsgemisches. Aus seiner Eichkurve geht jedoch allein hervor, daß nur die Schwefelsäuremenge verändert wurde bei konstanter Bichromatmenge, so daß der Beweis für die Abhängigkeit in der Konzentration des Bichromats nicht erbracht wurde. In der oben erwähnten Erwiderung Krainicks dagegen wurde eine Veränderung der Bichromatkonzentration bei einer bestimmten Schwefelsäurekonzentration vorgenommen, die eine nur unwesentliche Schwankung der Ausbeuten untereinander herbeiführt. Dies stimmt in gewisser Hinsicht mit unseren Erfahrungen überein. Auch wir finden bei Anwendung einer 10% Schwefelsäurelösung, die im Konzentrationsgemisch einen Gehalt von etwa 2,5% ergibt — also bei mittleren Schwefelsäuremengen — nur geringe Schwankungen infolge von Änderungen der Bichromatkonzentration. Bei anderen Konzentrationsverhältnissen haben wir jedoch verschiedene Acetonausbeuten erzielt als unter den eben angeführten Bedingungen. Doch zeigte sich bei diesen Veränderungen des Mischungsverhältnisses eine mangelnde Konstanz der gefundenen Werte.

Während also auch Krainick, wie wir, im Prinzip mit kleinen Schwefelsäuremengen arbeitet, hält Cantoni die Verwendung hochkonzentrierter Schwefelsäure für nötig unter gleichzeitiger Verwendung kleinster Bichromatmengen. Dies hatte Lauersen schon s. Zt. zur Nachprüfung der Verhältnisse veranlaßt und im folgenden soll noch einmal eingehend der experimentelle Beweis für die Berechtigung der von Lauersen gegebenen Vorschrift gebracht werden.

Nach dem Kurvenbild in Abb. 2 zu urteilen, sinkt die Acetonausbeute bei Erhöhung der Schwefelsäurekonzentration und der Bichromatmenge, während kleine Schwefelsäure- und Bichromatmen-

gen die beste Acetonausbeute ergaben. Man ist zuerst geneigt, diese Verhältnisse bei der Acetonbestimmung zugrunde zu legen, da die Kurve bei Anwendung dieser kleinen Mengen einen steilen Abfall der bei der stufenphotometrischen Ablesung gefundenen Durchlässigkeitswerte zeigt und auf größte Acetonausbeute schließen läßt. Die Durchlässigkeitswerte bleiben aber bei Verwendung kleinerer Bichromatmengen im biologischen Material nicht konstant, weil neben der β-Oxybuttersäure auch mit der Anwesenheit anderer reduzierender Substanzen gerechnet werden muß, die eine mehr oder weniger große Menge des Bichromats beanspruchen. Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, erhält man die konstantesten Werte bei mittlerer Schwefelsäurekonzentration und einer größeren Menge Bichromat. Wenn auch die β-Oxybuttersäure nicht zu 100% in Aceton übergeführt wird, so ergibt sich doch eine Verläßlichkeit hinsichtlich der relativen Höhe der Acetonausbeute. Auf Grund dieser Tatsache verwenden wir einen Überschuß an Bichromat, der zwar eine geringere, aber konstante Acetonausbeute liefert. Wesentlich ist aber, immer auf die genaue Innehaltung der Versuchsbedingungen, die der zu verwendenden Eichkurve zugrunde liegen, zu achten.

Bei Betrachtung der Kurven ergibt sich die größte Konstanz der Werte bei 10 ccm 10%iger Schwefelsäure und 10 ccm 5%igem Kaliumbichromat (.....Kurve) — innerhalb gewisser Grenzen der Bichromatmengen ist eine Änderung nur von geringem Einfluß — so daß wir diese Versuchsbedingungen zur β-Oxybuttersäurebestimmung benützen.

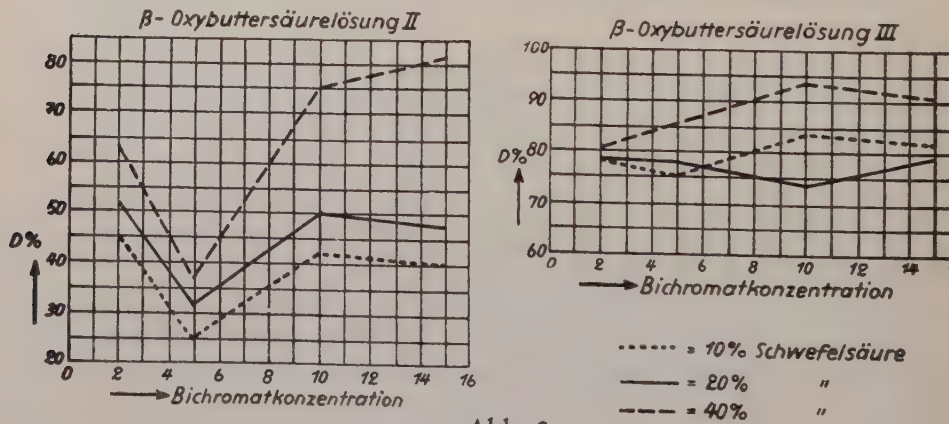


Abb. 2.

Trennungsgrundlagen für β-Oxybuttersäure und Milchsäure.

Durch die Anwendung verschiedener Oxydationsmittel und durch die Kombination des stufenphotometrischen und des jodometrischen Verfahrens ergibt sich eine Trennungsmöglichkeit in der Erfassung von β-Oxybuttersäure und Milchsäure.

Für die Trennung beider Säuren bestehen folgende Möglichkeiten: Einmal kann das Untersuchungsmaterial in der Destillationsapparatur mit Kaliumbichromat behandelt werden. Dabei entsteht allein Aceton aus der β-Oxybuttersäure, während der intermediär aus Milchsäure gebildete Acetaldehyd oxydativ weiter abgebaut wird. In einer Salicyldehydvorlage wird unter diesen Bedingungen also nur Aceton gebunden. Anschließend kann bei einer zweiten Destillation bei Anwendung von MnO_2 in einer Bisulfitvorlage der Acetaldehyd aus der Milchsäure erfaßt werden. Zu einem bestimmten Teil entsteht dabei aber auch aus der β-Oxybuttersäure Aceton, das also bei der jodometrischen Titration der Bisulfitvorlage miterfaßt wird. Unter normalen Umständen spielt diese Erhöhung der Werte durch den Acetonanteil aus β-Oxybuttersäure eine nur unwesentliche Rolle, da die Konzentration der β-Oxybuttersäure gegenüber der Milchsäure im Blut an sich sehr niedrig ist und obendrein im Gegensatz zur fast 100%igen Umsetzung der Milchsäure in Acetaldehyd nur ein geringer Teil der β-Oxybuttersäure in Aceton übergeführt wird. Die Erfassung dieses β-Oxybuttersäureanteils läßt sich durch Anwendung einer Destillation mit MnO_2 unter Benützung einer Salicylaldehydvorlage praktisch durchführen. Bei diesem Vorgehen erhalten wir eine Färbung, die dem Absorptionswert des Acetonanteils der β-Oxybuttersäure und daneben dem Absorptionswert des gesamten Acetaldehyds aus der vorliegenden Milchsäure entspricht. Das Verhältnis zwischen den Absorptionswerten ist aber derart, daß die durch Aceton hervorgerufene Färbung etwa 200mal stärker ist gegenüber der Milchsäurefärbung. Der Absorptionswert für Milchsäure kann also vernachlässigt werden.

Schematisch zusammengefaßte Aufstellung der Trennungsmöglichkeiten für β-Oxybuttersäure und Milchsäure.

1. a) Salicylaldehydvorlage und Bichromatoxydation gibt nur β-Oxybuttersäure,
   b) Bisulfitvorlage und Bichromatoxydation ebenfalls nur β-Oxybuttersäure.
   Grund: Der intermediär entstehende Acetaldehyd wird zerstört.

2. a) Salicylaldehydvorlage und MnO_2-Oxydation gibt einen Teil der β-Oxybuttersäure (und die geringe Absorption für Milchsäure),
   b) Bisulfitvorlage und MnO_2-Oxydation gibt den Teil der β-Oxybuttersäure (s. 2a) und die gesamte Menge Milchsäure.
   Für gewöhnlich genügt die Bestimmung nach 1a und 2b völlig.

3. Für besondere Fragestellungen muß man vom Milchsäurewert den Rest der β-Oxybuttersäure in Abzug bringen.
   Also nacheinander für die exakte Milchsäurebestimmung 2a und 2b durchführen.
   Vom Jodverbrauch der Bestimmung 2b wird der errechnete Jodverbrauch für 2a abgezogen.
   Ergebnis: reine Milchsäure.

Eichung der Apparatur.

Bei der praktischen Durchführung der beschriebenen Bestimmungsverfahren empfehlen wir, stets nach ganz bestimmten Regeln, die für die benutzten Apparaturen mit Hilfe von Testanalysen festgelegt wurden, vorzugehen. Eine uns sehr zweckmäßig erscheinende Grundeichung, die wir bei der Inbetriebnahme neuer Apparate anzuwenden pflegen, sei noch kurz angegeben. Die gesamte Apparatur wird in der für die Bestimmung des Leerwertes üblichen Weise beschickt, lediglich mit dem Unterschied, daß in das Vorlagegefäß zu dem Salicylaldehydgemisch bestimmte Mengen von Acetonlösungen gegeben werden, die aber nicht über 1 ccm liegen dürfen.

Die so erzielte Färbung wird den eigentlichen, nunmehr folgenden Destillationsbestimmungen zugrunde gelegt. Wir müssen also die Arbeitsbedingungen, d. h. die Gesamtdestillationsdauer und die Zeit bis zum ersten Sieden der Flüssigkeit im Destillationskolben auf diesem Wege festlegen. Dadurch passen wir die von uns gegebene Arbeitsvorschrift den schwer konstant zu haltenden räumlichen Verhältnissen bei der Herstellung der Destillationsapparatur individuell an. Die gleiche Prüfung der Destillationsapparatur läßt sich auch bei Verwendung einer Bisulfitvorlage durchführen, in die Aceton oder Acetaldehyd gegeben wird.

Aufstellung der Eichkurven: Zur Aufstellung der empirischen Eichkurve legten wir eine Acetonlösung zugrunde, die im ccm 0,0062 mg Aceton enthält. Dieser Wert wurde durch Titration mittels Bisulfit bestimmt. Die Herstellung dieser Lösung, die wir als Lösung III bezeichnen, geschieht durch hundertfache Verdünnung einer Lösung, in der genau 1 ccm Aceton (puriss. Merck) im Liter enthalten ist. Mittels dieser Testlösung wurden die Durchlässigkeitswerte bei Anwendung verschiedener Mengen 1,0—2,0—3,0—4,0—5,0—6,0—8,0 und 10,0 ccm mit dem Stufenphotometer für Filter 57 bestimmt und auf logarithmisches Papier aufgetragen. Die Verwendung von Logarithmenpapier hat den Vorteil, daß man die Absorptionswerte sofort auftragen kann, ohne die Extinktionswerte berücksichtigen zu müssen. Die Ablesungen in D% werden als Ordinate, die entsprechenden Konzentrationen (in Gamma) als Abszisse gezeichnet und die einzelnen Meßpunkte verbunden. Es zeigt sich dann bei der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes ein geradliniger Verlauf der Kurve. Es läßt sich aber auch unter Benützung des Extinktionskoeffizienten eine Eichkurve aufzeichnen, in welcher der Extinktionskoeffizient $k = -\log \% D$ als Ordinate und die Konzentration als Abszisse eingetragen ist.

Beide Kurven gehen im allgemeinen nicht durch den Nullpunkt, da die Lösung infolge der Eigenfärbung eine Durchlässigkeit unter 100% zeigt. Die Kurve verläuft jedoch parallel zur Nullkurve durch den Punkt der Ordinate, der dem jeweiligen Leerwert entspricht.

Entsprechend den Kurven für Filter 57 lassen sich auch Eichkurven für Filter 53 darstellen. Siehe Tabelle I S. 20 und Kurven 3 a, b, c.

Tab. I

Beispiel für die Aufstellung von Eichkurven u. der Faktorberechnung.

Vorlagegef. aufgefüllt bis Marke 10 ccm.

Testlös. Aceton III		Filter 57				Filter 53			
ccm	mg	D %	k_n	$k_n - k_o$	$f = \frac{c}{k_n - k_o}$	D %	k_n	$k_n - k_o$	$f = \frac{c}{k_n - k_o}$
1	0,0062	82	0,086	0,045	0,14	44	0,357	0,265	0,023
		83	0,081	0,040	0,16	43	0,367	0,275	
2	0,0124	77	0,114	0,073	0,17	38	0,420	0,328	0,028
		78	0,108	0,067	0,19	30	0,523	0,431	
3	0,0186	70,5	0,152	0,111	0,17	19	0,721	0,629	0,030
		71	0,149	0,108	0,17	15	0,824	0,732	
4	0,0248	65	0,187	0,146	0,17	13	0,886	0,794	0,031
		66	0,181	0,140	0,18	11	0,959	0,867	
5	0,031	58	0,237	0,196	0,16	8	1,097	1,005	0,031
		59	0,229	0,188	0,17	7,5	1,125	1,033	
6	0,0372	56	0,252	0,231	0,16	6	1,222	1,130	0,031
8	0,0496	46	0,337	0,296	0,17	2,5	1,602	1,510	0,033
		47	0,328	0,287	0,17	2	1,699	1,607	
10	0,062	38,5	0,415	0,374	0,17	1,2	2,000	1,829	0,032
		39	0,409	0,368	0,17	1		1,908	
Durchschnitt					0,17			ohne 1 ccm	0,031
Leerwert D%=91 k_o=0,041					D%=83 k_o=0,092			mit 1 ccm	0,029

Aufgefüllt bis Marke 20.

1	0,0062	88	0,056	0,020	0,31	65	0,187	0,136	0,048
		89	0,051	0,015	0,41	66	0,181	0,129	
2	0,0124	87	0,061	0,025	0,50	60	0,222	0,169	0,059
		84	0,076	0,040	0,31	55	0,260	0,209	
3	0,0186	82	0,086	0,050	0,37	44	0,357	0,306	0,061
		81	0,092	0,056	0,33	43	0,367	0,316	
4	0,248	77,5	0,111	0,075	0,33	34	0,469	0,418	0,059
		77	0,114	0,078	0,32	33	0,482	0,431	
5	0,0310	76	0,119	0,083	0,37	29	0,538	0,487	0,064
		75	0,125	0,089	0,35	28	0,552	0,501	
6	0,0372	73	0,137	0,101	0,37	24	0,620	0,569	0,066
		72	0,143	0,107	0,35	23	0,638	0,586	
		71	0,149	0,113	0,33				
8	0,0496	68	0,168	0,132	0,38	17	0,770	0,719	0,068
		67	0,174	0,138	0,36	15	0,824	0,773	
10	0,062	63	0,201	0,165	0,38	11	0,959	0,908	0,067
		62	0,208	0,172	0,37	10	1,000	0,949	
Durchschnitt					0,34			ohne 1 ccm	0,063
Leerwert D%=92 k_o=0,036					D%=89 k_o=0,051			mit 1 ccm	0,062

Ablesewerte für eine Acetonlösung in der Verdünnung 1 : 1 000 000.

Acetonlösung IV		Filter 57		Filter 53	
ccm	mg	D %	n	D %	k_n
1	0,00062	91	0,041	85	0,071
		90	0,046	79	0,102
		90,5	0,043	80,5	0,094
2	0,00124	90	0,046	76	0,119
		89	0,051	75	0,125
3	0,00186	89	0,051	69,5	0,158
		89,5	0,049		
4	0,00248	89	0,051	64,5	0,191
		88	0,056	65	0,187
5	0,00310	88,5	0,053	60	0,222
		87	0,061		
		86	0,066		
8	0,00496	85	0,071	48	0,319
		84	0,076		
Leerwert		$K_O = 0{,}036$		$K_O = 0{,}066$	

Vorlagegefäß aufgefüllt bis 10 ccm.

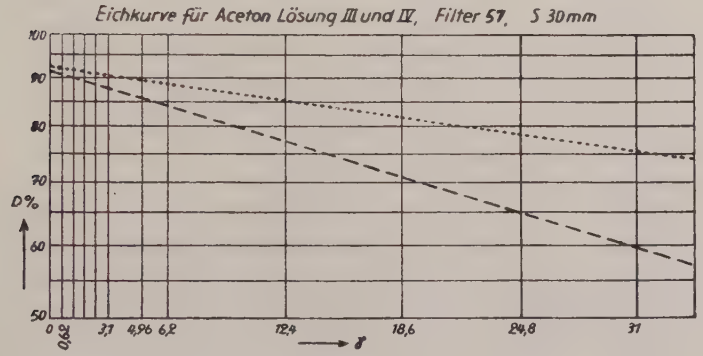


Abb. 3a.

Obige Abb. 3a zeigt Eichkurve für Aceton bei der die Abszisse (Gamma) in größerem Maßstab gez. wurde, um auch die Werte für Lösung IV deutlicher zum Ausdruck zu bringen ((siehe Abb. 3 b)

– – – – – : Vorlagegefäß bis 10 ccm auf g.

..... : „ „ 20 ccm auf g.

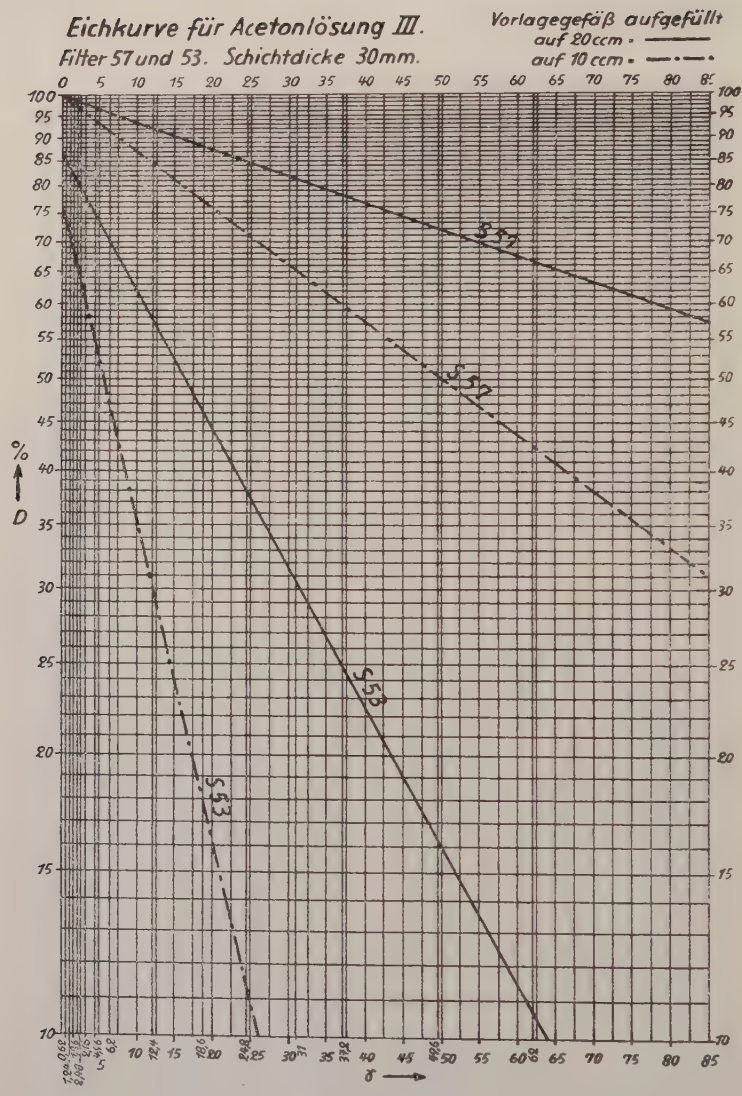

Eichkurve für Acetonlösung III.
Filter 57 und 53. Schichtdicke 30mm.
Vorlagegefäß aufgefüllt
auf 20ccm
auf 10ccm
S 57
S 57
S 53
S 53
% D
γ

Abb. 3b.

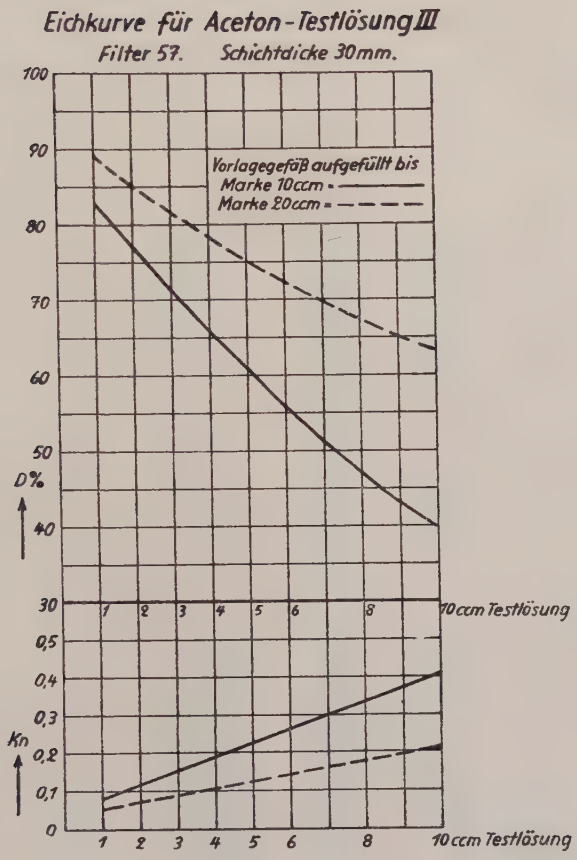

Eichkurve für Aceton-Testlösung III
Filter 57. Schichtdicke 30mm.
Vorlagegefäß aufgefüllt bis
Marke 10ccm =
Marke 20ccm =
D%
Kn
10ccm Testlösung
10ccm Testlösung

Abb. 3c.

Werte für β-Oxybuttersäure-Testlösungen.

Vorlagegef. aufgefüllt bis Marke 10 ccm.

β-Oxybuttersänre-lösung II ccm	D %	Filter 57 k_n	k_n-k_o	Mittelwert k_n-k_o	bezogen auf 1 ccm
		K_o=0,041	D%=91		
0,5	84	0,076	0,035		
	83	0,081	0,040	0,045	0,090
	79	0,102	0,061		
1	75	0,125	0,084		
	74	0,131	0,090	0,090	0,090
	73	0,137	0,096		
2	62	0,208	0,167		
	60	0,222	0,181	0,176	0,088
	60	0,222	0,181		
3	50	0,301	0,260		
	49	0,310	0,269	0,272	0,90
	47	0,328	0,287		
4	41	0,387	0,346		
	37	0,432	0,391	0,378	0,095
	36,5	0,438	0,397		
5	32	0,495	0,454		
	31	0,509	0,468	0,465	0,093
	30,5	0,515	0,474		
6	29	0,538	0,497		
	27	0,569	0,528	0,535	0,089
	24	0,620	0,579		
β-Oxybuttersäure-lösung III ccm		K_o=0,022	D%=95		
2	91	0,041	0,019		
	90,5	0,043	0,021	0,028	0,014
	88	0,056	0,034		
	87	0,061	0,039		
4	84	0,076	0,054		
	83	0,081	0,059	0,058	0,015
	83	0,081	0,059		
	82,5	0,083	0,061		
6	80	0,097	0,075		
	79	0,102	0,080	0,082	0,014
	78	0,108	0,086		
	77,5	0,111	0,089		
8	76,5	0,116	0,094		
	76	0,119	0,097	0,101	0,013
	75	0,125	0,103		
	74	0,131	0,109		
10	70	0,155	0,133		
	69,5	0,158	0,136	0,152	0,015
	65	0,187	0,165		
	64	0,194	0,172		

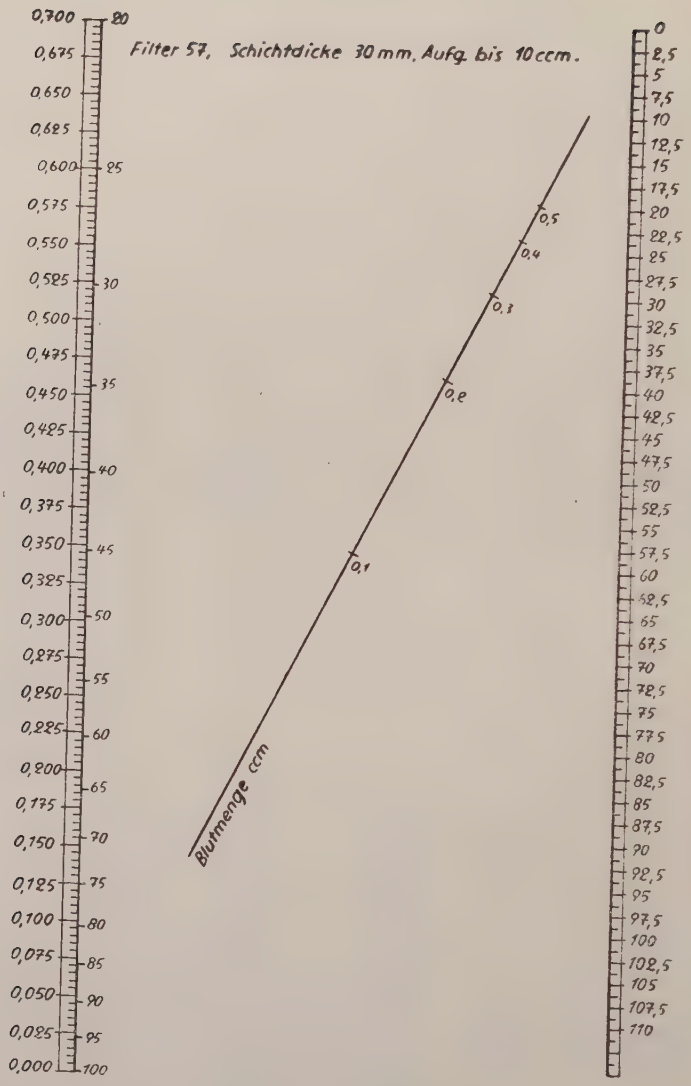
D = Absorptionswert, k_n = entsprechender Extinktionswert, k_o = Leerwert

Siehe auch Abb. 1.

Ausarbeitung eines Nomogramms.

Um die Errechnung der Ketonkörper möglichst schnell und einfach zu gestalten, empfiehlt sich die Aufstellung eines Nomogramms (siehe Abb. 4 a, b Nomogramm). Auf der linken Seite des Nomogramms wird die Absorption als — log D oder in D% aufgetragen. Die Punkte auf der Schräglinie zeigen die jeweils verwendeten Blutmengen an, auf der rechten Senkrechten sind die mg% aufgezeichnet.

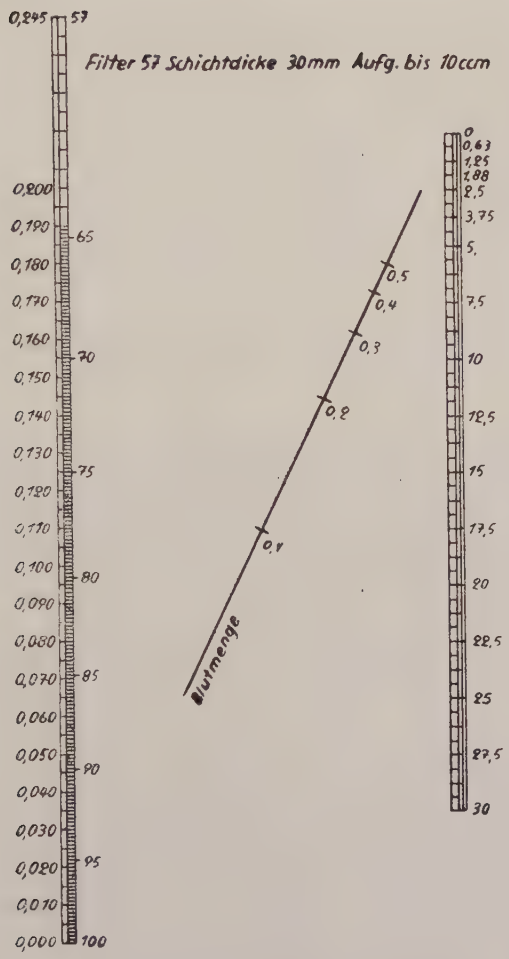
Beim Anlegen eines Lineals durch die Punkte, die der jeweils angewandten Blutmenge und der für sie ermittelten Extinktion entsprechen, gibt der Schnittpunkt mit der dritten Linie die mg%-Konzentration an. Das Nomogramm ist also viel einfacher als eine Eichkurve zu handhaben. Das zweite Nomogramm ist als Teilstück in vergrößertem Maßstab gezeichnet, um niedere mg%-Werte besser ablesbar zu machen.



Nomogramm.

Durch den abgelesenen Extinktionswert an der linken Skala und durch die angewandte Blutmenge ist ein Lineal zu legen. Dieses schneidet auf der rechten Skala den gesuchten mg%-Wert.

Abb. 4a.



Nomogramm.

Teilstück der ersten Nomogramms in vergrößertem Maßstab gezeichnet, um die niederen mg%-Werte besser ablesen zu können.

Abb. 4b.

Beschreibung des Mikroverfahrens.

Vorarbeiten: Reagenzien: 2/30 n Schwefelsäure, 1%ige Natriumwolframatlösung. In zwei Zentrifugengläser werden je 3 ccm Natriumwolframatlösung und 3 ccm 2/30 n Schwefelsäure, sowie 1 ccm Wasser gegeben.

Blutentnahme und Enteiweißung: Aus der Fingerbeere werden für eine Doppelbestimmung 0,4 ccm Blut entnommen und in die vorbereiteten Zentrifugengläschen je 0,2 ccm gegeben, darnach wird die Flüssigkeit in den Gläsern bis ungefähr 10 ccm mit Aqua dest. aufgefüllt.

Die so behandelten Blutmengen läßt man unter mehrmaligem Umschütteln etwa 15 Minuten stehen und zentrifugiert anschließend 5 Minuten.

In den meisten Fällen genügt es aber auch vollkommen, wenn nur 0,1 ccm Blut (Doppelbestimmung 0,2) verwendet werden. Die Enteiweißung erfolgt dann durch Zugabe von 2 ccm Na-Wolframat und 2 ccm 2/30 n Schwefelsäure und anschließendes Auffüllen mit Aqua dest. auf 10 ccm.

Bestimmung des Acetons: Reagenzien: 10%ige Lösung von Salicylaldehyd (Merck D.A.B. 6) in 95%ig. Alkohol, 60%ig. Kalilauge, 10%ig. Schwefelsäure, 5%ig. Kaliumbichromatlösung.

Bestimmung: Die beiden enteiweißten Blutfiltrate werden jeweils in einen Erlenmeyerkolben der Destillationsapparatur nach Lauersen gebracht und die Zentrifugengläschen vorsichtig an der Wandung mit Wasser ausgewaschen — hierbei darf der Rückstand des Filtrats beim Abspülen nicht aufgewirbelt werden — um das ganze Blutfiltrat zu erfassen und der Rest ebenfalls in den Kolben gegeben. Das Blutfiltrat wird jetzt mit 10%ig. Schwefelsäure versetzt und 3—4 Körnchen, mit Lauge ausgekochter und geglühter Bimsstein (Kahlbaum) zugefügt, um ein gleichmäßiges Sieden zu gewährleisten, der Inhalt des Elenmeyerkolbens auf 40 ccm Wasser aufgefüllt.

Das Vorlagegefäß wird mit 1 ccm der Salicylaldehydlösung und 2 ccm der 60%ig. Kalilauge beschickt, gut durchgemischt und in die Apparatur gebracht. Nach Einsetzen des Kühlers 20 Minuten destil-

liert. Die Flüssigkeit im Erlenmeyerkolben soll nach 7 Minuten zum gleichmäßigen Sieden kommen. Etwa 5 Minuten nach Abschluß der Destillation wird der Kühler soweit herausgehoben, daß das Ansatzstück ein wenig in die Vorlage hineinragt und die am Kühler noch haftenden Reste der Reagenzflüssigkeit mit Wasser in die Vorlage hineingespült. Hierauf wird das Vorlagegefäß mit einem Haken herausgenommen und genau bis zur Marke 10 ccm mit Wasser aufgefüllt. Die Farblösung wird dann wiederholt in ein Reagenzglas umgegossen, um eine vollständige Durchmischung zu erzielen. Die Ablesung im Stufenphotometer soll erst nach völliger Abkühlung vorgenommen werden. Das Reagenzglas wird solange gut verschlossen aufbewahrt. In eiligen Fällen kühlt man das Reagenzglas unter fließendem Wasser ab.

Bestimmung der β-Oxybuttersäure: In den Kolben wird neben einigen neuen Bimssteinkörnchen eine neue Vorlage (Salicylaldehyd-Kalilauge) eingefügt und nach Zusammensetzung der gesamten Apparatur 10 ccm der 5%ig. Bichromatlösung durch den Trichter hinzugegeben. Abgesehen von der Bichromatzugabe ist die Bestimmung der β-Oxybuttersäure vollkommen die gleiche wie die Bestimmung des Aceton. Die β-Oxybuttersäure wird dann zu Aceton oxydiert und destilliert.

Bestimmung von Gesamtaceton: Eine Bestimmung der Gesamtacetonkörper gibt wohl einen Überblick über die Menge der Ketonkörper, es lassen sich aber daraus keinerlei Schlüsse über das Verhältnis von Aceton, β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure ziehen. Gerade beim Coma diabeticum kann das Verhältnis zwischen Aceton und β-Oxybuttersäure die verschiedensten Werte annehmen. (Siehe Kurve der Pat. Rüg. Abb. 5.) Ein weiterer Fehler ergibt sich daraus, daß eine rechnerische Berücksichtigung der nicht 100%igen Umsetzung der β-Oxybuttersäure in Aceton auf diese Weise nicht möglich ist.

Die Ermittlung der Höhe des Gesamtacetons ist aber dann von Wert, wenn es darauf ankommt, möglichst schnell festzustellen, ob eine starke Erhöhung der Acetonkörper vorliegt.

Die Bestimmung des Gesamtacetons erfolgt wie bei Aceton, nur wird in den Erlenmeyerkolben sofort die Bichromatlösung gegeben und damit Aceton und β-Oxybuttersäure als Aceton in einer Destillation erhalten.

Errechnung der Aceton- und β-Oxybuttersäurewerte.

Die Menge des Acetons wird aus der aufgestellten Eichkurve ermittelt (siehe Eichkurve Abb. 6). Den am Stufenphotometer gefundenen Absorptionswert sucht man auf der logarithmischen Kurve oder einer Eichkurve unter Zugrundelegung des entsprechenden Leerwertes auf. Aus der Eichkurve läßt sich der erhaltene Wert in Gamma ablesen. Durch Multiplikation mit 100 für 0,1 ccm bzw. mit 500 für 0,2 ccm Blut erhält man die Acetonmenge in mg%.

Bei der Bestimmung der β-Oxybuttersäure wird der so gewonnene Acetonwert noch mit der empirisch gefundenen Zahl 2,58 multipliziert.

Wesentlich einfacher ist die Berechnung mittels des beigefügten Nomogramms (s. Abb. 4a und b).

Ebenso kann man mit Hilfe des Faktors (für Filter 57 ist f—0,17), der unter Zugrundelegung einer Testlösung gewonnen wurde, den Acetonwert ermitteln.

Berechnung: Acetonmenge für 0,1 ccm Blut ist dann c = f. (k—ko), wobei f—0,17, k = Extinktionswert des Aceton, ko = Extinktionswert des Leerwertes.

Praktisches Beispiel:

Ketonkörperbestimmung bei Patientin M. Rüg., 42 Jahre, Coma diabeticum.

Blutabnahme			Gesamtaceton		Aceton		β-Oxybuttersäure		
				errechnete				Menge in mg% als	
Tag	Zeit	Menge ccm	F 57	Menge mg%	F 57	Menge mg%	F 57	Aceton	β-Oxybuttersäure
13. 2.	9	0,1	64 65	27					
	10^{30}	0,2	51,5 52	22					
	12^{30}	0,2		44,75	34 35	36,5	74 77	8,25	21,4
	16	0,1 0,3		18,6	76 55	13,3	80,5 77	5,3	13,7
	20	0,2		12	78 77	7,5	84 85	4,5	11,6
	21	0,2		6	85 84	4	90 91	2	5,18
14. 2.	9	0,2		5,5	90 91	2	87 86	3,5	9,05
	14	0,2		1,5	94 93	1	95 94	0,5	1,29
	20	0,1		6	92 93	3	92 93	3	7,75
15. 2	7	0,1		10,5	86 87	3,5	93 94	2	5,18
	16^{30}	0,1		3	93 93	2	94 95	1	2,58

Tag	Zeit	Insulingabe	Tag	Zeit	Blutzucker mg%
13. 2.	7	40 E iv + 40 E iv	13. 2.	6^{30}	552
	10	20 E sc		8^{30}	480
	11	40 E sc + 40 g Dextr		11^{30}	438
	15	40 E + 40 g Dextr		16^{30}	408
	18	50 E sc		18^{45}	308
	18^{15}	50 E iv		20	200
	19^{30}	35 E sc		21	198
	22	30 E sc			
14. 2.	10^{30}	20 E	14. 2.	5	78
	11	15 E		8^{15}	181
	12	25 E		11^{40}	290
	15	20 E		16^{30}	111
	17^{50}	10 E			
15. 2.	11^{30}	15 E	15. 2.	8^{50}	188
	17^{30}	15 E		16^{45}	267

Bildliche Darstellung hierzu s. S. 32.

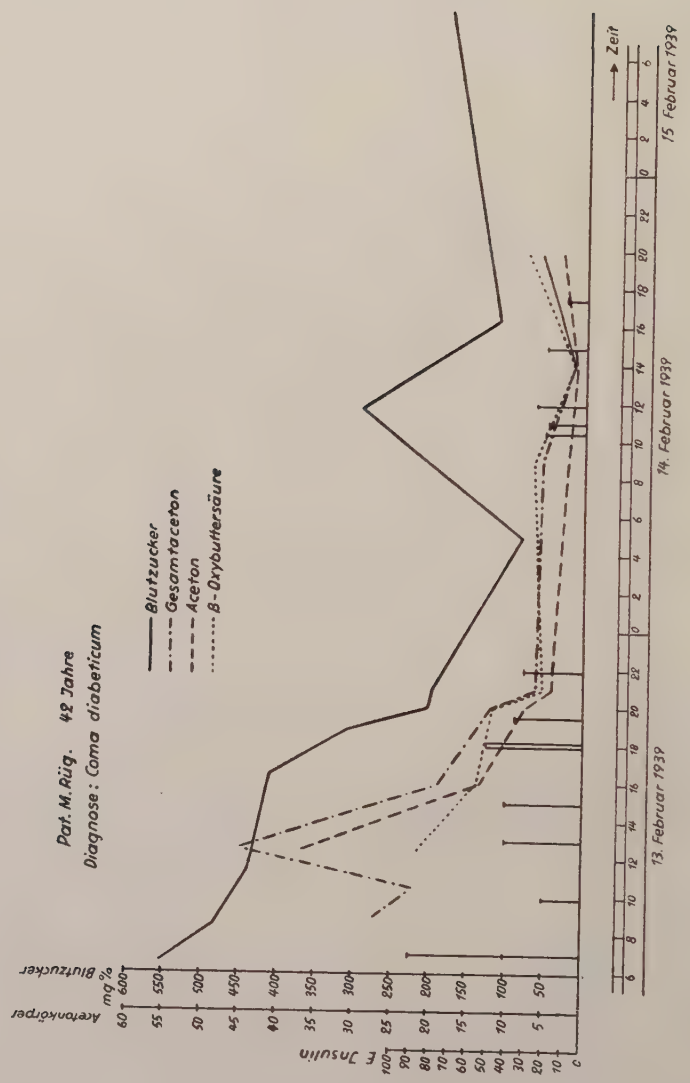

Part. M. Rüg. 42 Jahre
Diagnose: Coma diabeticum
Blutzucker
Gesamtaceton
Aceton
β-Oxybuttersäure
Blutzucker mg %
Aceton körper
E Insulin
Zeit
13. Februar 1939
14. Februar 1939
15 Februar 1939

Abb. 5.

Eichkurve zur Acetonbestimmung für verschiedene Leerwerte.

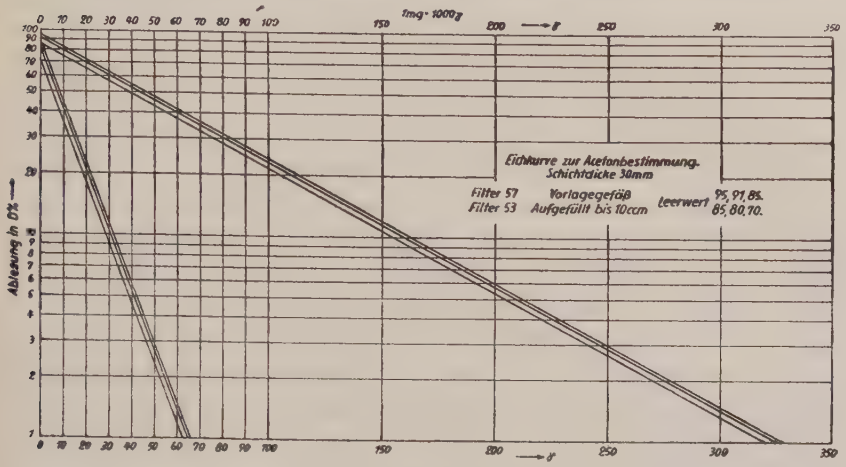


Abb. 6.

Milchsäurebestimmung.

Bei der Bestimmung der Milchsäure halten wir an der Methode nach Lauersen-Wahlländer fest.

Prinzip: Durch Anwendung eines schwachen Oxydationsmittels, einer MnO_2-Aufschwemmung in schwefelsaurer Lösung, wird die Milchsäure mit nahezu 100% Ausbeute durch die Destillation in Acetaldehyd überführt. Dieser wird dann in Form der Bisulfitverbindung zur Bestimmung gebracht.

Wie wir bereits zeigen konnten, ist die stufenphotometrische Bestimmung mit Salicyldehyd für Milchsäure nicht geeignet. Wir stellten zwar auch für Milchsäure (Verd. 1 : 10) eine Eichkurve in derselben Weise wie bei Aceton auf, um die Arbeitsbedingungen zu prüfen und Fehler auszuschalten.

Es wurde auch versucht, mittels verschiedener Aldeydverbindungen (von F. Merck in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt) eine geeignete Farbtrennung für Aceton und Milchsäure zu erhalten. Die Versuche gehen in dieser Richtung weiter.

Um immer die fast 100%ige Acetaldehydausbeute zu erhalten, müssen vor allem die genauen Arbeitsvorschriften beachtet werden.

Daß bei Verwendung von Kaliumbichromatlösung der Acetaldehyd oxydativ weiter abgebaut wird und sich hieraus Trennungsmöglichkeiten für β-Oxybuttersäure und Milchsäure ergeben, ist schon erwähnt worden. Wir konnten weiterhin feststellen, daß die Milchsäurewerte besonders von der Qualität und dem Reinheitsgrad des Mangansuperoxyds abhängig sind. Es ist bekannt, daß selbst kleinste chemische Verunreinigungen häufig katalytisch wirken. So erzielten wir bei dem bisher in Verwendung gewesenen MnO_2 bei der Milchsäurebestimmung stets eine vollständige Ausbeute. Bei Benützung eines gefällten und schwefelfreien MnO_2 ergab sich jedoch eine viel geringere Milchsäuremenge als dem wirklichen Milchsäurewert entspricht. So mußte also dem früher benutzten MnO_2 ein in geringer Menge vorhandener unbekannter katalytisch wirkender Stoff beigefügt gewesen sein. Wir haben deshalb dem reinen MnO_2 Mangansulfat zugesetzt und erzielten jetzt die vorgelegten Milchsäuremengen wieder zurück.

Aus dem bisher Gesagten ergeben sich also für die Milchsäurebestimmung folgende Arbeitsvorschriften:

Reagenzien: 1%ige Bisulfitlösung, 40 Vol.%ige Schwefelsäure, Mangansuperoxyd gekörnt, ca. 90% (F. Merck), 1%iges $MnSO_4$, 1 n- und 1/200 n-Jodlösung, sek. Natriumphosphat, 1/200 n Thiosulfatlösung.

Ausführung: Von dem enteiweißten und entzuckerten Blutfiltrat (1 : 20) wird je nach der zu erwartenden Milchsäuremenge ein bestimmtes Quantum in den Erlenmeyerkolben gebracht und mit einem gehäuften Löffelchen Mangansuperoxyd versetzt. Dazu kommen 10 ccm der jeweils angewandten (40%igen) Schwefelsäure, 3 ccm 1%iges Mangansulfat, einige Siedekörnchen aus Bimsstein, der Inhalt des Kolbens wird auf 40 ccm mit Wasser aufgefüllt. Die Vorlage wird mit 2 ccm Bisulfit beschickt. Die weitere Bestimmung geschieht in derselben Weise wie bei der titrimetrischen Bestimmung des Acetons und ist in der Arbeit von Lauersen und Wahlländer nachzulesen. Die für die Titration der Acetaldehydbisulfitverbindung verbrauchte Menge 1/200 n-Jodlösung wird mit 0,225 multipliziert und liefert die Anzahl Milligramm Milchsäure in der angewandten Menge Untersuchungsmaterial.

Zusammenfassung.

Einleitend werden die Voraussetzungen für die exakte Erfassung von intermediären Stoffwechselvorgängen eingehend erörtert. Hieraus ergibt sich für die an unserer Klinik vor allem im Rahmen des Rest-Kohlenstoffproblems zu bearbeitenden Aufgaben die Forderung, auf möglichst breiter Basis zu arbeiten. Hierzu müssen zur Durchführung der verschiedenen Bestimmungen die nötigen Blutmengen durch Venenpunktion gewonnen werden. Unter diesen Gesichtspunkten war eine Beschränkung auf kleinste Blutmengen nicht unbedingt erforderlich. Bei den früheren an unserer Klinik durchgeführten Arbeiten wurde deshalb im wesentlichen bei der Ausarbeitung von Bestimmungsverfahren der Hauptwert auf die exakte und leichte Durchführbarkeit der einzelnen Bestimmungen im Rahmen eines größeren Fragegebietes gelegt.

Jedoch erlaubt diese Tatsache nicht die systematische Verfolgung durch zahlreiche Reihenversuche im Laufe eines Tages an ein und demselben Pat., so daß für bestimmte engbegrenzte Fragestellungen ausgesprochene Mikroverfahren nötig sind, um die Möglichkeit zu haben, durch Aufstellung von Tagesprofilen ein Bild von dem Verhalten dieser Stoffe unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen zu gewinnen und gewisse Einwirkungen des Fett- und Kohlehydratstoffwechsels laufend zu kontrollieren. Wir haben deshalb ein Verfahren ausgearbeitet, das die Bestimmung der Acetonkörper bis zu einem Gamma erlaubt.

Die Mikromethode stellt eine Verfeinerung des Verfahrens zur Acetonkörperbestimmung nach Lauersen dar. Die Verbesserungen bestehen vor allen Dingen in folgenden Punkten: Durch ein geringeres Volumen der erhaltenen Farblösung wird eine fast vollständige stufenphotometrische Auswertung des Farbeffekts ermöglicht. Trotz stärkerer Intensität der Absorptionen in zahlreichen anderen

Spektralgebieten wurde die Ablesung mit Filter 57 beibehalten, da die Verwendung anderer Filter häufig Störungen im biologischen Material ergab.

Unter diesen Bedingungen stört der aus Milchsäure gebildete Acetaldehyd die Bestimmung im Stufenphotometer nicht, da der Absorptionswert einer bestimmten Milchsäuremenge etwa 200mal schwächer ist, als der einer entsprechenden Acetonmenge. In diesem Zusammenhang wird auf die Versuche von Schwenkenbecher eingegangen, der glaubt, störende Einflüsse verschiedener Substanzen auf die Acetonbestimmung angeben zu können. Die Mengen, die Schwenkenbecher benützt, stehen aber in keinem Verhältnis zu den tatsächlich vorhandenen. Durch systematische Vergleichsversuche von unserer Seite wurde der Einfluß störender Stoffe auf die Bestimmung kontrolliert und keine praktisch wahrnehmbaren Veränderungen gefunden.

In der Literatur bestehen zahlreiche Widersprüche über den Einfluß der Schwefelsäurekonzentration und Bichromatmenge auf die Acetonausbeute bei der Bestimmung der β-Oxybuttersäure. Aus diesem Grunde wurden nochmals systematische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde ein optimales Mischungsverhältnis gefunden, das zwar nicht den maximalen Wert liefert, sich aber durch weitgehende Konstanz der Werte gegenüber den anderen Konzentrationsverhältnissen auszeichnet.

Im Zusammenhang mit dieser Bestimmung wurden gleichzeitig die verschiedenen Möglichkeiten einer Trennung von β-Oxybuttersäure und Milchsäure erörtert, die sich unter den in dieser Arbeit gefundenen Gesichtspunkten ergeben.

Um die Arbeitsvorschriften jeweils den nicht immer konstanten Raumverhältnissen der Destillationsapparatur individuell anzupassen, wird eine bestimmte Grundeichung der Apparatur vorgeschlagen, aus der sich die Bedingungen für die zweckmäßigste Anordnung des Verfahrens ergeben.

Die Anfertigung der zur Bestimmung der Acetonkörper nötigen Eichkurven wurde in ihrer zweckmäßigsten Form beschrieben. Zur weiteren Vereinfachung der Auswertung von Analysenergebnissen wird die Aufstellung und Handhabung eines Nomogramms erörtert.

Nach diesen Ausführungen folgt die eigentliche Beschreibung des Bestimmungsverfahrens. An Hand eines Beispiels wird die Bedeutung der Acetonkörpererfassung als Hilfsmittel für die Therapie des diabetischen Komas nachgewiesen.

Abschließend werden einige Richtlinien für die zweckmäßigste Durchführung der Milchsäurebestimmung im Blut, die sich im Rahmen dieser Arbeit ergeben haben, angeführt und die optimale Zusammensetzung des Oxydationsgemisches für die quantitative Überführung der Milchsäure in Acetaldehyd festgestellt.

Am Schlusse der Arbeit sei es mir gestattet, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. W. Stepp, für die gütige Überlassung des Themas und Übernahme des Referates meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. F. Lauersen verpflichtet, der mich in entgegenkommender Weise bei Verfassung der Arbeit durch seine wertvollen Ratschläge unterstützte.

Schrifttum:

K. J. Anselmino u. Fr. Hoffmann: Exp. Medizin 94/1934, p. 305.
E. Becher, H. Bohnenkamp u. a.: Lehrbuch der spez. path. Physiologie.
C. Brentano: Münch. med. Wchschr. 1937 II, p. 1411.
O. Cantoni: Biochem Ztschr. 274 p. 45, 277 p. 448, 279 p. 201.
— Klin. Wchschr. 1938/II p. 1479.
E. Ernst u. J. Truka: Biochem. Ztschr. Bd. 272/1934.
R. Fricke: Ztschr. physiol. Chemie 116 p. 129/1921.
P. Galvao, C. Florence e J. Pereira: Arquivos do Instituto Biologico Vol. 9 Artigo 4, 1938 (Sao Paulo).
Handbuch der normalen und patholog. Physiologie, Bd. V, Bd. IV, Verlag Julius Springer, 1928.
L. Heilmeyer: Abderhaldens Handbuch, Abtlg. II Teil 2/II, 1929.
— Klin. Wschr. 21, 1933.
— Medizin. Spektrophotometrie, Verlag Fischer, Jena 1933.
— Ztschr. ges. exp. Med. 58, 1927, 59, 1928.
K. Hinsberg u. K. Lang: Medizin. Chemie, Verlag Urban u. Schwarzenberg 1938, Berlin und Wien.
Hoppe-Seyler: Handbuch der physiol. u. path. chem. Analyse, 1924.
H. Krainick: Klin. Wschr. 15, 1938.
F. Lauersen: Biochem. Ztschr. 280, 1935.
— Klin. Wschr. 15, 1936.
— Klin. Wschr. 16, Nr. 34, 1937.
— Mikrochemie Bd. XXV, 1938.
F. Lauersen u. H. Wahlländer: Biochem. Ztschr. Bd. 298, 1938.
F. Lehnartz: Chem. Physiologie.
Neubauer-Huppert: Analyse des Harns.
W. Neuweiler: Klin. Wschr. 12, 1933.
N. Poczka: Dtsch. Arch. Klin. Med. 183, 1938.
Rona u. H. Kleinmann: Praktikum der physiol. Chem. 1929.
W. Schwenkenbecher: Ztschr. Klin. Med. 134, p. 325, 1938.
E. Spaeth: Chem. u. mikroskopische Untersuchung des Harns 1936.
R. Sturm: Archiv f. exp. Pathologie 167, 1932.
C. Urbach: Biochem Ztschr. Bd. 265, 4.—6. Heft, 1933.
— Klin. Wschr. Jahrgang 10, 1931.
— Klin. Wschr. Nr. 43, 1933.

Lebenslauf.

Ich, Josef Frauenreuther, wurde am 26. Mai 1913 als Sohn des derzeitigen Reichsbahn-Amtmanns Johann Frauenreuther zu Würzburg geboren. Nach Ablegung der Reifeprüfung im März 1932 an der Rupprecht-Oberrealschule zu München ergriff ich das Studium der Medizin an der Universität München. Nachdem ich von Februar bis Mai 1934 meiner studentischen Arbeitsdienstpflicht genügt hatte, bestand ich im Herbst 1934 an der Universität München das Physikum und am 27. Dezember 1937 die ärztliche Prüfung ebenfalls in München. Das praktische Jahr leistete ich an der Heil- und Pflegeanstalt Gabersee und an der 1. Medizinischen Universitätsklinik in München ab. Seit Abschluß des praktischen Jahres bin ich als Volontärassistent in dem klinisch-chemischen Forschungslaboratorium der 1. Medizinischen Klinik München tätig. Ich bin Pg., Angehöriger der SA. und des NS.-Ärztebundes.